

**BIOCOMPATIBLE HYALURONIC ACID GEL AND ITS APPLICATION****BEST AVAILABLE COPY**

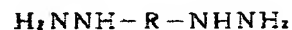
AI

**Patent number:** JP9059303  
**Publication date:** 1997-03-04  
**Inventor:** KIYOTA YUKO; UENO NORIO  
**Applicant:** SHISEIDO CO LTD  
**Classification:**  
- international: A61L27/00; A61L31/00; C08B37/08; A61L27/00; A61L31/00; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/08; A61L27/00; A61L31/00  
- european:  
**Application number:** JP19950234598 19950822  
**Priority number(s):** JP19950234598 19950822

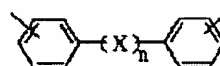
Report a data error here

**Abstract of JP9059303**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a water-insoluble hyaluronic acid gel prepared by the condensation reaction of hyaluronic acid with a crosslinking agent such as dihydrazine, almost free from cytotoxicity, expressing appropriate elasticity, excellent in transparency, get stability and biocompatibility and suitable for vitreous body, etc. **SOLUTION:** This gel is prepared by the condensation reaction of hyaluronic acid with a crosslinking agent such as di(or bi)hydrazine or di(or bi)hydrazide such as succinic acid dihydrazide of formula I R is 4-8C alkylenedicarbonyl, a (substituted) bicyclic condensed-ring residue containing a six-membered heterocyclic ring group having two nitrogen atoms or formula II [X is a lower alkylene or SO<sub>2</sub>; (n)=0, 1].



I



II

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-59303

(43) 公開日 平成9年(1997) 3月4日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/08			C 0 8 B 37/08	Z
A 6 1 L 27/00			A 6 1 L 27/00	D
				V
				T
31/00			31/00	

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平7-234598	(71) 出願人	000001959 株式会社資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号
(22) 出願日	平成7年(1995) 8月22日	(72) 発明者	清田 優子 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂第2リサーチセンター内
		(72) 発明者	上野 則夫 神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会社資生堂第1リサーチセンター内
		(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉 (外1名)

(54) 【発明の名称】 生体適合性ヒアルロン酸ゲル及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 透明で細胞毒性を殆ど示さず、かつ生体内での使用適する弾性をもつヒドロゲルの提供。

【解決手段】 ヒアルロン酸と架橋剤ジ(もしくはビ)ヒドラジン又はジ(もしくはビ)ヒドラジドとの縮合反応によって形成された水不溶性ヒアルロン酸ゲル、並びにその生体適合性材料への使用。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸と架橋剤ジ（もしくはビ）ヒドラジン又はジ（もしくはビ）ヒドラジドとの縮合反応によって形成された水不溶性ヒアルロン酸ゲル。

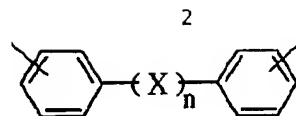
【請求項2】 架橋剤が、次式



（式中、RはC<sub>1-8</sub>のアルキレンジカルボニル又はヘテロ原子として窒素原子2個を有する6員の複素環式基を含む置換されていてもよい二環式縮合環残基であるか、或いは式

【化1】

\*

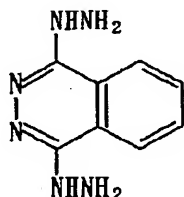


ここで、Xは低級アルキレン又は-SO<sub>2</sub>-であり、nは0又は整数1であり、そしてベンゼン環は置換されていてもよいで示される2価の基又は単結合である）で表わされる請求項1記載のヒアルロン酸ゲル。

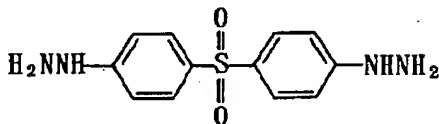
【請求項3】 架橋剤がコハク酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、及びスベリン酸ジヒドラジド並びに

10 式

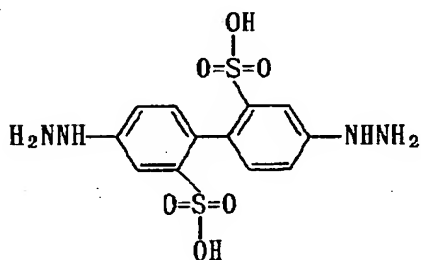
\* 【化2】



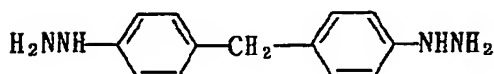
(a)



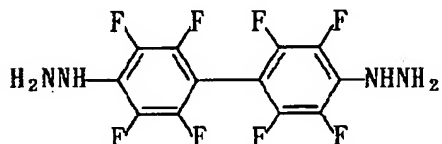
(b)



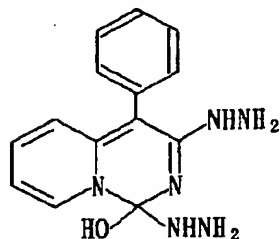
(c)



(d)



(e) 及び、



(f)

で示されるジ（もしくはビ）ヒドラジン類からなる群より選ばれる化合物又はその塩である請求項1記載のヒア

ルロン酸ゲル。

50

【請求項4】 請求項1記載のヒアルロン酸ゲルを含ん

でなる生体適合性組成物。

【請求項5】 硝子体で使用するための請求項4記載の生体適合性組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

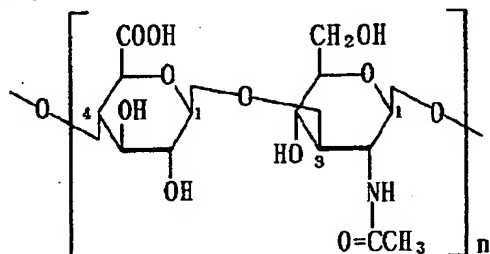
【発明の属する技術分野】本発明は、新規なヒアルロン酸ゲル及びその生体適合性材料としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸は、次式

【0003】

【化3】



【0004】で表わされる $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸が交互に結合してできた直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に多量に分布するほか、ニワトリのときか、カイコの胃腔膜、連鎖球菌の莢膜などにも存在が知られている。臍帯、関節液、硝子体等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調製されている。

【0005】天然産のヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。さらに、生体に適用する場合のヒアルロン酸自体に随伴する短所、例えば、生体内滞留時間が比較的に短いこと、などから多種多様なヒアルロン酸の化学修飾物も提案されている。

【0006】これらの代表的なものとしては、ジビニルスルホン、ビスエポキシド類、ホルムアルデヒド、ビスハロゲン化物等の二官能性試薬を架橋剤に使用して、得られた高膨潤性の架橋ヒアルロン酸ゲルを挙げることができる（米国特許第4,582,865号明細書、特公平6-37575号公報、特公平5-37575号公報参照）。

【0007】また、主として、ドラッグデリバリーシステムの担体としての使用を意図するが、一定のカルボジイミドとヒアルロン酸との反応により安定なヒアルロン酸アシルウレアが製造できることも知られている（国際公開第45/02517号パンフレット参照）。ところで、かかる反応系で活性化されたヒアルロン酸に求核性試薬（例えば、アミン類）を反応させることにより、水不溶性の生体適合性ゲルが製造できることも知られている（米国特許第4,937,270号明細書参照）が、反

応条件次第では、アミン成分による分子間カップリング物は観察されないともいわれている（J. Kuo, 等, Bioconjugate Chem. 1991, 2, 232-241）。後者の研究結果は、求核性試薬の不存在下で特定のカルボジイミドを用いてもヒアルロン酸の架橋生成物が得られるとの上記J. Kuo等の国際公開第93/07106号パンフレットに記載の発明に符合する。

【0008】カルボジイミド類により活性化されたヒアルロン酸（オリゴマー）に求核性試薬として、コハク酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド又はスベリン酸ジヒドラジドを反応させた例が、T. Pouyani 等, Bioconjugate Chem. 1994, 5, 339-347, に記載されている。より具体的にはこの刊行物は、カルボジイミドの存在下でヒアルロン酸のオリゴ糖に大過剰（30モル倍）のジヒドラジドを反応させて、そのグルクロン酸部分へ側基（ペンダント）ヒドラジド基が結合された化合物、さらに側基ヒドラジド基を利用して一定のジスルホネート架橋剤で架橋したヒアルロン酸のヒドロゲルが得られることも公表している。しかし、ジヒドラジド自体でヒアルロン酸を直接架橋できるか否かについては未載である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らも、ヒアルロン酸自体の生体適合性材料としての使用について多角的に検討した。その中で興味深いものとしては、最新の顕微鏡手術器具の進歩と新しい考え方により、手術が可能になってきた重篤な網膜剥離に対する硝子体手術への適用が挙げられる。

【0010】元来、ヒアルロン酸は硝子体液中に含まれるものであるが、硝子体腔での滞留時間が短いため、重篤な増殖性網膜症などの硝子体手術後の硝子体腔への適用は満足できる結果をもたらさなかった。その他、多種多様な高分子（天然物又は人工物）が網膜硝子体手術に用いられてきたが十分に満足できるものは未だ開発されていない。

【0011】すなわち、硝子体置換物として用いるには、材料が

（1）透明であり、屈折率は水に近似し、そして比重は水と同等か若干大きいこと、（2）無菌、非抗原性、無毒性であること、（3）剥離した網膜を複位させるのに充分な期間（2～3箇月）硝子体内に存在できるだけの滞留性があること、及び（4）手術中に切開部から注入、或いは移植できること、の要件を少なくとも具備する必要があるからである。

【0012】これらの要件を具備する材料は、その他の生体での用途、例えば、治療用及び使い捨てコンタクトレンズ、人工乳房、人工関節の摺動部、並びに人工皮膚等へも適用可能であろう。

【0013】従って、本発明の目的は、上記要件を具備

する生体適合性材料を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために、ヒアルロン酸の各種化学修飾を検討してきた。その結果、上述のJ. Kuo等、Biocojugate Chem. 1991, 2, 232-241には、ジカルボジイミドの存在下でのヒアルロン酸とアミン類との反応ではアミド化合物（ヒアルロン酸のカルボキシル基とアミノ基との縮合反応生成物）が得られていないにもかかわらず、アミン類に代えて特定のジ（もしくはビ）ヒドラジン又はジ（もしくはビ）ヒドラジドを使用すると、ヒアルロン酸のゲルが効率よく得られることを本発明者らは見出した。さらに、こうして得られたゲルは、上記硝子体置換物に要求される性質をほぼ具備することも確認された。

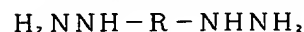
【0015】従って、本発明によれば、ヒアルロン酸と架橋剤ジ（もしくはビ）ヒドラジン又はジ（もしくはビ）ヒドラジドとの縮合反応によって形成された水不溶性ヒアルロン酸ゲルが提供される。また、そのようなゲルを含んでなる生体適合性組成物、特に、硝子体で使用

【0016】

【発明の具体的な態様】本発明によれば、ヒアルロン酸（以下「HA」と略記する場合もある）は、天然産のHAであれば、その起源を問うことなく使用できるので、その分子量は約 $6 \times 10^4$ ～約 $1.2 \times 10^7$ ダルトンの範囲内のものであれば、いずれも使用することができる。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等を介して得られた低分子量のものも同様に使用できる。なお、本発明に

例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、の塩をも包含する概念で使用していることを理解されたい。

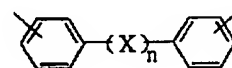
【0017】HAを架橋するのに使用する架橋剤は、本発明の目的に沿うゲルを調製できる二官能性のジ（もしくはビ）ヒドラジン又はジ（もしくはビ）ヒドラジドであればその種類を問わないが、一般には、2個のヒドラジノ基が3個以上の原子により一定の間隔を保っていることが必要である。具体的には、次式



（式中、RはC<sub>1-10</sub>のアルキレンジカルボニル又はヘテロ原子として窒素原子2個を有する6員の複素環式基を含む置換されていてもよい二環式縮合環残基であるか、置換されている場合の置換基は、メチル、エチル等の低級アルキル基、フッ素、塩素等のハロゲン、スルホン酸基及びフェニル基からなる群より選ばれるか、或いは式

【0018】

【化4】

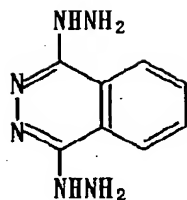


【0019】ここで、Xはメチレン、エチレン及びプロピレンからなる群より選ばれる低級アルキレン又はスルホニルであり、nは0又は整数1であり、ベンゼン環は上記置換基によって置換されていてもよい2価の基又は単結合である）で示されるジ（もしくはビ）ヒドラジン又はジ（もしくはビ）ヒドラジドである。

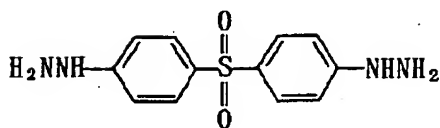
【0020】限定されるものでないが、より具体的には、コハク酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド及びスベリン酸ジヒドラジド、並びに式

【0021】

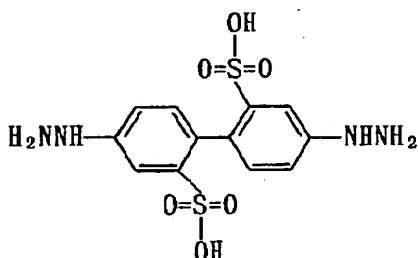
【化5】



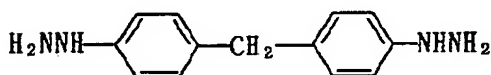
(a)



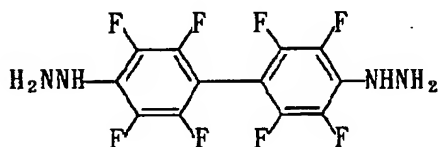
(b)



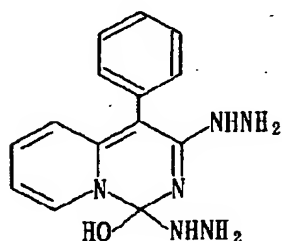
(c)



(d)



(e) 及び、



(f)

【0022】のジ(もしくはピ)ヒドラジンを挙げることができる。

【0023】これらのうち、硝子体置換物に使用するに  
40 は、上記(1)～(4)の性質に加え、生理食塩液中での膨潤性が低いことも要求されることから、このような膨潤性が一般的に低いゲルを生成する上記ヒドラジン類によって架橋されたゲルが好ましい。

【0024】本発明のゲルは、上記HAのβ-D-グルクロン酸に由来するカルボキシル基と架橋剤に由来するヒドラジノ基との脱水縮合反応により製造されうるものである。このような脱水縮合反応を起こし、目的のゲル化物を得ることができる反応様式であれば、どのような反応様式に基づいて得られたものでも本発明のゲルに包  
50

含される。しかし、生体適合性材料として使用することを考慮すれば、HAの特性に悪影響を及ぼすことなく、未反応出発原料や副生成物から目的のゲルを容易に分離できる反応系を選ぶことが好ましい。

【0025】このような反応系としては、水性反応溶媒系で目的のゲルが得られるカルボジイミド類の存在下で、HAと架橋剤を反応させるのが好ましい。使用できるカルボジイミド類としては水に溶解する1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(以下「EDC」という)、シクロヘキシル-β-(N-メチルモルホリノ)エチレンカルボジイミドp-トルエンスルホネート及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドメチオダイドを好まし

いものとして挙げることができるが、最も好ましいものはEDCである。

【0026】以下、この好ましい反応系でアジピン酸ジヒドラジド（以下「AAD」と略記する場合もある）又は上記式（a）で示される1, 4-ジヒドラジノフタラジン〔ジヒドララジン（以下「DHZ」と略記する場合もある）を架橋剤として用い、そしてHAとして約 $2 \times 10^6$ ダルトンのものを用いる場合を引用しながら本発明をさらに具体的に説明する。なお、反応挙動は、HAの分子量変化により殆んど影響を受けない。

【0027】上記反応系による場合、HA濃度は0.5～5.0重量/重量%に設定するのが反応液の処理上好都合であるが、好ましくは0.8～1.5重量/重量%に設定するのがよい。HAナトリウム塩濃度を約1.2重量/重量%に設定する場合を例にとると、その $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸との2糖単位に換算すると、この2糖単位は約0.03mol/1に相当する。この換算値を基準にして、カルボジイミドEDC並びに架橋剤AAD及びDHZの使用量を適宜選ぶことができるが、通常、EDCは、意図する架橋率に応じ、HAに対して約0.13～0.67モル当量となるように使用するのがよい。また、同様に架橋剤もHAに対して0.13～0.67モル当量となるように選ぶのがよい。無論、架橋率は反応時間、反応温度によっても左右されるが、便宜上、それぞれ、反応がほぼ終了する時点まで進行する反応時間及び反応温度に従って説明する。

【0028】その他、反応の進行は、反応液のpHによっても影響を受けるので、通常、反応液はジ（もしくはピ）ヒドラジド類についてはpH3～4に調整するのが好ましい。

【0029】一方、ジ（もしくはピ）ヒドラジン類については、反応液をpH3～8に調整して縮合反応を行うことができるので、通常、pHの調整を行う必要がない。反応温度は、20～25℃の室温が好都合であり、この場合、AADを用いると、ほぼ40～60分で完了し、DHZを用いると、ほぼ120～140分で完了する。

【0030】このような反応条件は、経時的に反応液の各種吸光度、例えば紫外線吸収スペクトルや蛍光スペクトルを測定するかより確実を期すならば、赤外線吸収スペクトル（IR）を測定することにより所望の架橋度を達成できるか否かを判定することにより適宜選ぶことができる。フーリエ変換赤外線吸収スペクトル（FT-IR）による場合、例えば、対照としてHAを選び、次に経時変化する次の吸収の変化を観察すればよい。例えば、DHZを使用する場合、

1413  $\text{cm}^{-1}$ ：カルボキシル（ $-\text{COO}-$ ）のC-Oによる吸収、及び

1377  $\text{cm}^{-1}$ ：C-Hの変角振動の吸収に着目すれ

ば、（1377  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度/1413  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度）の変化は、架橋の進行状況を反映するであろうし、又

1650  $\text{cm}^{-1}$ ：アミド（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）のC-Oによる吸収、及び

1614  $\text{cm}^{-1}$ ：カルボキシル（ $-\text{COO}-$ ）のC-Oによる吸収に着目すれば、（1650  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度/1614  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度）の変化も架橋の進行状況を反映するであろう。

10 【0031】こうして、所望の架橋率を示すゲルを調製することができる。

【0032】一般的に、HAの上記二糖単位の換算モル数に対して、カルボジイミドと架橋剤を増加すればする程、架橋率を高めることができる。架橋率は、上記反応の進行に伴う吸光度の変化を考慮し、二糖単位の一対を架橋に関与する単位として使用架橋剤量及び未反応架橋剤量から概算すると、架橋率が約29%～85%のものは、透明なゲルを形成し、適当な粘弾性を示し、生理食塩液による膨潤度の変化（上昇）もあまり認められず、かつ培養細胞を用いる細胞毒性試験において殆んど毒性（細胞増殖抑制）を示さない。

20 【0033】従って、本発明の架橋HAゲルは、生体適合性材料、例えば、人工硝子体（硝子体置換物）、人工水晶体（調節力を有する人工水晶体）、治療用コンタクトレンズ、使い捨てコンタクトレンズ、人工乳房、人工関節の摺動部、及び人工皮膚等に使用できるであろう。

【0034】

【実施例】以下、具体例により本発明をさらに詳細に説明する。なお下記説明においてパーセンテージは特記しない限り（重量/重量）%を意味する。

30 【0035】実施例1～16：DHZを用いるゲルの調製

室温（25℃付近）で試験管に、1.2%HA水溶液1mLを入れ、0.05～0.2mol/LのEDC 0.1mLを加え、3分間攪拌した後0.05～0.2mol/LのDHZ 0.1mLを、加え3分間攪拌した。得られたゲル1.2mLに生理食塩液120mLを加えて19時間透析した後、試験管内のゲルの状態を観察した。その結果を図1に略記する。こうして得られたゲルは、すべて生理食塩水に不溶性であり、固有の膨潤性をもつことからハイドロゲルが生成していることがわかる。また、DHZは波長310nm付近に吸収極大を示すが、上記透析により未反応DHZは容易にゲルから分離できることが確認されている。

40 【0036】なお、図中の各組み合わせの例番号は、左から右へ、そして最上欄から、順次下欄に向かって、例1～例16である。これらの例のうち、EDCの使用濃度が0.2mol/LでDHZの使用濃度が0.1mol/Lである例8によるゲルは、上述の架橋率の算出式によると、約56.4%の理論上の架橋率を示す。

【0037】実施例17~20: 生成ゲルの生理食塩液中の透析による重量変化(試行2回の平均)

上記例4(使用濃度:  $\text{DHZ} = 0.05 \text{ mol/L}$ 、 $\text{EDC} = 0.2 \text{ mol/L}$ )、例8(使用濃度:  $\text{DHZ} = 0.1 \text{ mol/L}$ 、 $\text{EDC} = 0.2 \text{ mol/L}$ )、例12(使用濃度:  $\text{DHZ} = 0.15 \text{ mol/L}$ 、 $\text{EDC} = 0.2 \text{ mol/L}$ )及び例16(使用濃度:  $\text{DHZ} = 0.2 \text{ mol/L}$ 、 $\text{EDC} = 0.2 \text{ mol/L}$ )に従ってそれぞれ得られたゲル3mlに対し、室温(25℃)下に生理食塩水300ml;で透析を行った。透析は、生理食塩液を使用して処理した後、ゲルを回収した。得られたゲルの重量を経時的に測定した結果を図2に示す。

【0038】図からみられるように、 $\text{DHZ}$ が $0.05 \text{ mol/L}$ (例4)のゲルは21日間の透析で膨潤したが、 $\text{DHZ}$ が $0.12$ 及び $0.2 \text{ mol/L}$ (それぞれ、例12及び例16)のゲルは離水し凝縮した。 $\text{DHZ}$ が $0.1 \text{ mol/L}$ (例8)のゲルは変化がなかった。

【0039】これらのゲルを眼内で使用することを考慮すると、透析による変化が少ない方が好ましいので、 $\text{EDC}$ 濃度を $0.2 \text{ mol/L}$ に設定する場合には、 $\text{DHZ}$ 濃度は $0.1 \text{ mol/L}$ が適切である。

【0040】実施例21~25: 各種pH下で $\text{DHZ}$ を用いるゲルの調製

室温(25℃付近)で試験管に、あらかじめ透析法によりpHを調整した1%HA水溶液2ml(例21ではpH1、例22ではpH2、例23ではpH4、例24ではpH6、例25ではpH8に調整)を取り、 $0.04 \text{ mol/L}$ の $\text{EDC}$  1mlを加え3分間攪拌し、次いで $0.04 \text{ mol/L}$ の $\text{DHZ}$  1mlを加えてさらに3分間攪拌した。波長400nmにおける経時的な反応液の吸光度変化を測定し、反応挙動を追跡した。結果を図3に示す。

【0041】図より、反応はほぼ2~3時間で終了し、またpH1では反応が起こらないことがわかる。例21~25で得られたゲルを例1~16と同様に生理食塩液を加えて透析した後、ゲルを肉眼観察したところ、いずれも透明なゲルであるがpHが高くなるにつれて白色を帯びてくることが認められた。

【0042】実施例26~29: AADを用いるゲルの調製

室温(25℃付近)でそれぞれ試験管に1.2%HA水溶液1mlを入れ、 $0.04 \text{ mol/L}$ の $\text{EDC}$  0.1mlを加え3分間攪拌した後、1N HClによりpHを3.1(例26)、3.3(例27)、3.5(例28)に調整するか、あるいは、無調整(例29)のまま $0.06 \text{ mol/L}$ のAAD 0.1mlを加え3分間攪拌した。

【0043】例29の場合には白色のゲルを生成したが他の例はいずれも透明なゲルを生成した。例17~20の方法に従って、得られたゲルを生理食塩液中で透析した

ときの、ゲルの経時的な重量変化を図4に示す。なおこれらの結果は試行4回の平均値である。

【0044】図から、架橋剤としてAADを用いると $\text{DHZ}$ を用いた場合に比べ、ゲルが膨潤することが認められる。

【0045】実施例30: 赤外線吸収スペクトルの測定  
(1)  $\text{DHZ}$ を用いたゲル

例4( $\text{EDC}$   $0.2 \text{ mol/L}$ 、 $\text{DHZ}$   $0.05 \text{ mol/L}$ )、例8( $\text{EDC}$   $0.2 \text{ mol/L}$ 、 $\text{DHZ}$   $0.1 \text{ mol/L}$ )、例12( $\text{EDC}$   $0.2 \text{ mol/L}$ 、 $\text{DHZ}$   $0.15 \text{ mol/L}$ )、及び例16( $\text{EDC}$   $0.2 \text{ mol/L}$ 、 $\text{DHZ}$   $0.2 \text{ mol/L}$ )に従って得たゲルを乾燥後粉末にし、それぞれKBr錠にしてFT-IRを測定した。なお対照としてHAのFT-IRを測定した。

【0046】使用した機器は、Magna IR(商標) spectrometer 550(Nicolet製)を用いた。

【0047】HAと例8に従って得られたゲルのFT-IRスペクトルを、それぞれ図5及び6に示す。

【0048】HAに比べ、HA-ゲル( $\text{DHZ}$ )は、 $1413 \text{ cm}^{-1}$ 付近のカルボキシル( $-\text{COO}-$ )のC-Oによる吸収の強さに対する $1377 \text{ cm}^{-1}$ 付近のC-H変角振動による吸収の強さの比が大きくなり(すなわち、フリーのカルボキシル基の減少)、 $1614 \text{ cm}^{-1}$ 付近のカルボキシルのC-Oによる吸収の強さに対する $1650 \text{ cm}^{-1}$ 付近のアミド( $-\text{CO}-\text{NH}-$ )のC-Oによる吸収の強さの比が大きくなる(すなわち、フリーのカルボキシル基の減少とアミド結合の形成が認められる)。

【0049】対照、例4、例8、例12及び例16に従って調製したゲルについて、 $1650 \text{ cm}^{-1}/1614 \text{ cm}^{-1}$ 及び $1377 \text{ cm}^{-1}/1413 \text{ cm}^{-1}$ の吸光度比をプロットしたグラフを図7に示す。

【0050】この図から、架橋剤 $\text{DHZ}$ の使用濃度が高まるにつれて、フリーのカルボキシル基が相対的に減少し、架橋化がより進むことが認められる。

【0051】(2) AADを用いたゲル  
 $0.04 \text{ mol/L}$ の $\text{EDC}$ と $0.03$ 、 $0.06$ 及び $0.12 \text{ mol/L}$ のAADを用い、pHで反応させたこと以外、例26~29と同様な方法でゲルを調製した。

$0.06 \text{ mol/L}$ のAADを用いて得たゲルのFT-IRスペクトルを図8に示す。上記(1)と同様にC-O-NH-に由来する吸光度/C-OO-に由来する吸光度の比、及びC-Hに由来する吸光度/C-OO-に由来する吸光度の比を使用したAADの濃度に対してプロットしたグラフを図9に示す。これらの図から、C-O-NH-結合の形成によるゲル化は、AADの濃度に依りて進行することが認められる。

【0052】実施例31: ゲルの光透過性(光散乱)の



## 測定

硝子体注入後のHA-ゲルの光透過性を検討するため下記の実験を行った。2.5 mL用シリンジ（テルモ製）の先端をカッターで切り落とし、そこにピペット用プラスチックチップ（C-5000/GILSON）の先を切ったもの（切り口の内径：7 mm、2 mm、1.2 mm）を付けた3種のアプリーターを準備し、HA-ゲルをそれらのアプリーターに入れた。あらかじめ生理食塩液1 mLを満たしたディスポーサブルキューベット（1 cm×1 cm×4.5 cm）にそれらのアプリーターからHA-ゲルを注入し、それぞれの光透過性を分光光度計により波長550 nmで測定した。対照として1.2%のHA生理食塩溶液についても測定した。ゲルは例8（0.2 mol/LのEDC、0.1 mol/LのDHZ）に従って調製したものをを使用した。対照（HA）とゲル〔HA-ゲル（DHZ）〕の測定値の平均値を経時的にプロットしたグラフを図10の（a）と（b）にそれぞれ示す。

【0053】図により、パイプの開口径が大きい方がHA、HA-ゲルともに透過率は高く、HAと比べるとHA-ゲルはやや透過率が低くなった。2日目以降は90%以上の高い透過率が得られた。従って、HA-ゲルは硝子体腔に注入後も視力に大きな傷害を与えないと考えられる。

## 【0054】実施例32：弾性の測定

例4（0.2 mol/LのEDC、0.05 mol/LのDHZ）、例8（0.2 mol/LのEDC、0.1 mol/LのDHZ）、例12（0.2 mol/LのEDC、0.15 mol/LのDHZ）及び例16（0.2 mol/LのEDC、0.2 mol/LのDHZ）に従って調製したゲル、並びに対照（1.2% HA、0.2 mol/LのEDC、0.1 mol/LのDHZ）及びHAの動的貯蔵弾性率（ $G'$ ）を求めた。

【0055】測定は、MR-101型レオメーター（レオロジー社製）測定モード：直径30 mmの平行プレート、自動歪み制御、ギャップ2 mm）を用いて行った。結果を図11に示す。

【0056】図から、対照及びHAは角速度（ $\omega$ ）の上昇に伴って $G'$ が約150（dyn/cm<sup>2</sup>）から約1,200（dyn/cm<sup>2</sup>）に上昇するのに対し、HA-ゲル（DHZ）は、 $\omega$ の上昇に伴う $G'$ の上昇は緩やかであることが認められる。これらの結果から、HA-ゲルいずれも軟かい弾性体であり、生体への適用に適することがわかる。

## 【0057】実施例33：細胞毒性の測定

例8（0.2 mol/LのEDC、0.1 mol/LのDHZ）及び例27（0.04 mol/LのEDC、0.06 mol/LのAAD、pH4.0）に従って1% HA

水溶液を用い無菌的に調製したゲルの細胞毒性について検討する。

【0058】HA-ゲル（例8由来及び例27由来）0.2 mLを、それぞれ24ウェルプレートの底、あるいはインターカップに入れ、ウェル内で生理食塩液により透析した。そのウェルに $2.5 \times 10^4$ 個のヒト皮膚由来線維芽細胞を播種し、培養した（培地RITC 80-7、温度37℃、5%CO<sub>2</sub>下）。3、7、10日後に細胞の増殖の様子を倒立顕微鏡で観察した。

10 【0059】培養10日後、細胞はいずれも良好に増殖した。HA-ゲル（例8由来、あるいは例27由来）をインターカップに入れ、細胞とは非接触下で培養すると、細胞増殖は対照群に比べてほぼ同様かあるいはやや抑制の傾向がみられた。

## 【0060】

【発明の効果】本発明によれば、一定範囲の架橋度において透明であり、細胞毒性が殆どなく、適度な弾性を示し、かつ安定なゲルが提供される。このゲルは生体適合性材料として利用可能である。

## 20 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のゲルの使用架橋剤濃度変化及び使用カルボジイミド濃度変化に応じた外観を示す略図である。

【図2】架橋剤にDHZを使用し、各架橋剤濃度で得られたゲルの生理食塩液で透析した場合の経時的膨潤特性を示すグラフである。

【図3】架橋剤としてAADを使用する場合のゲル調製時におけるpH変化が、ゲル生成に与える影響を示すグラフである。

30 【図4】架橋剤にAADを使用し、各種pHで得られたゲルの生理食塩液で透析した場合の経時的膨潤特性を示すグラフである。

【図5】HAのFT-IRスペクトルを表す図である。

【図6】架橋剤にDHZを使用して得られたゲルのFT-IRスペクトルを表す図である。

【図7】各種使用架橋剤（DHZ）濃度を使用して得られたゲルのFT-IRスペクトルの特定波長における吸光度比を前記濃度変化に対してプロットしたグラフである。

40 【図8】架橋剤にAADを使用して得られたゲルのFT-IRスペクトルを表す図である。

【図9】各種架橋剤（AAD）濃度を使用して得られたゲルのFT-IRスペクトルの特定波長における吸光度比を前記濃度変化に対してプロットしたグラフである。

【図10】HA（対照）及び架橋剤にDHZを使用して得られたゲルの透過率をそれぞれ表すグラフである

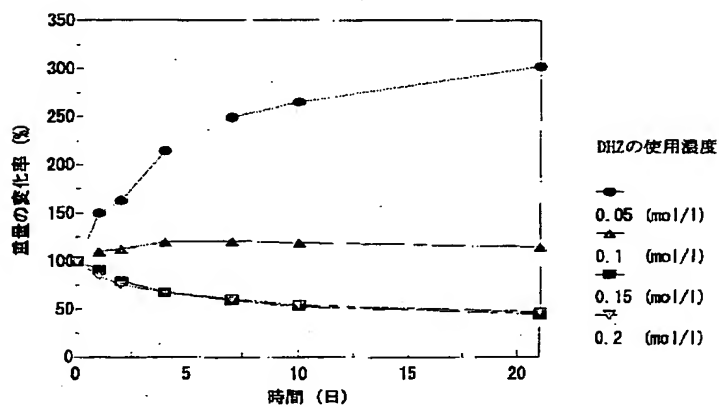
〔（a）：対照、（b）：ゲル〕。

【図11】各種架橋剤（DHZ）濃度で得られたゲルの弾性率を示すグラフである。

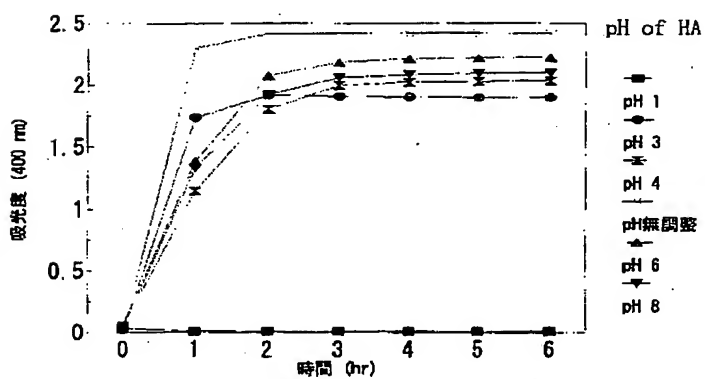
【図1】

		EDCの使用濃度 (mol/l)			
DHZ の使用濃度 (mol/l)	EDC	0.05	0.1	0.15	0.2
	0.05	例1 無色透明	例2 無色透明	例3 無色透明	例4 無色透明
	0.1	例5 無色透明	例6 無色透明	例7 無色透明	例8 無色透明
	0.15	例9 無色透明	例10 無色透明	例11 無色透明	例12 少し白濁
	0.2	例13 無色透明	例14 無色透明	例15 無色透明	例16 白濁

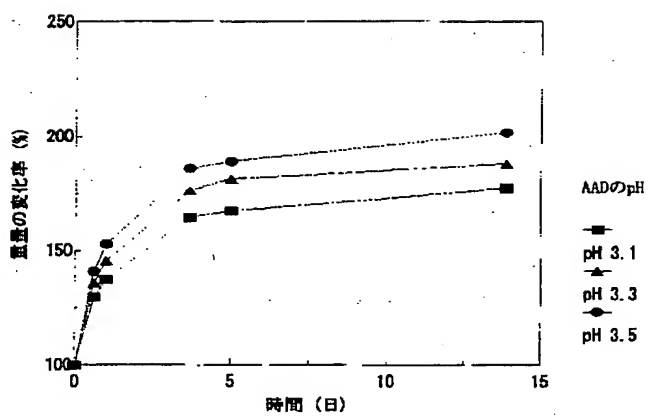
【図2】



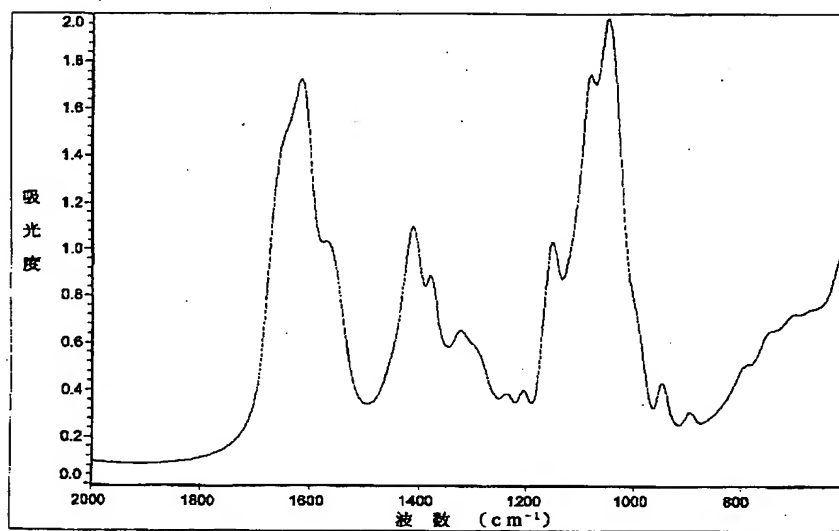
【図3】



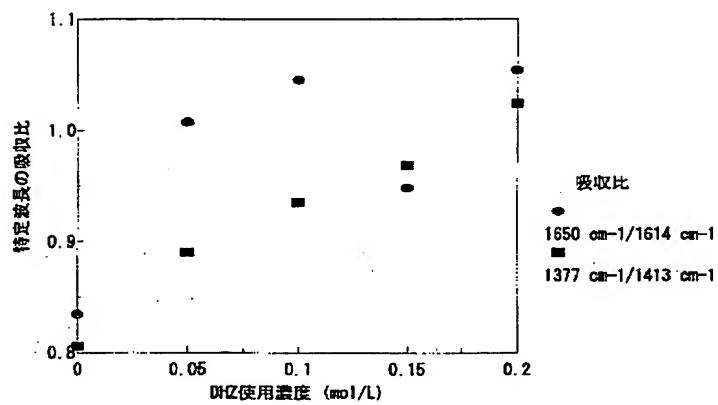
【図4】



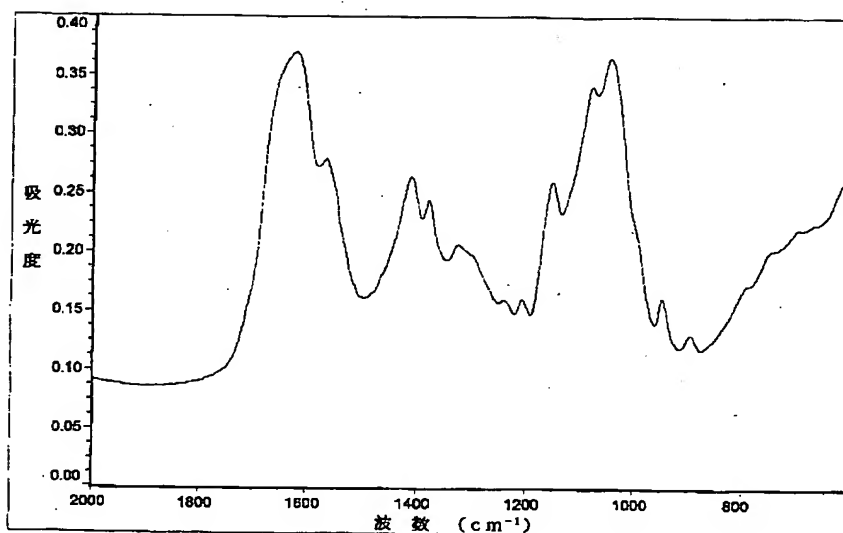
【図5】



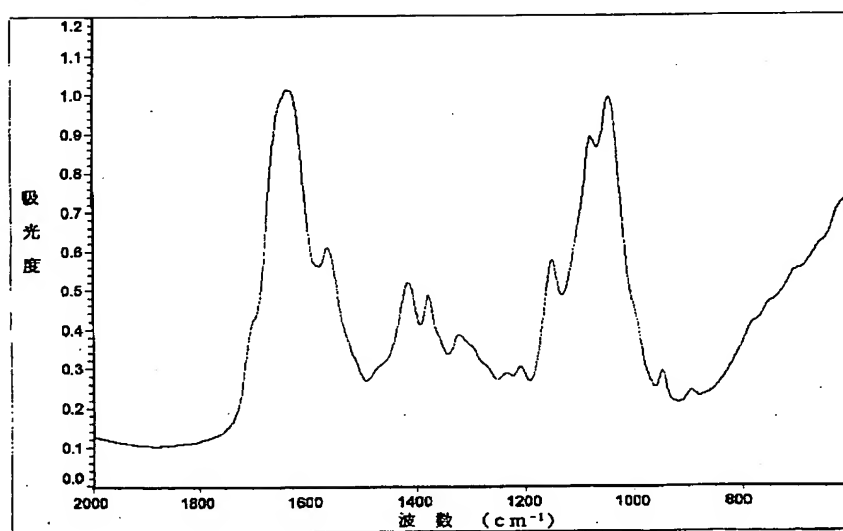
【図7】



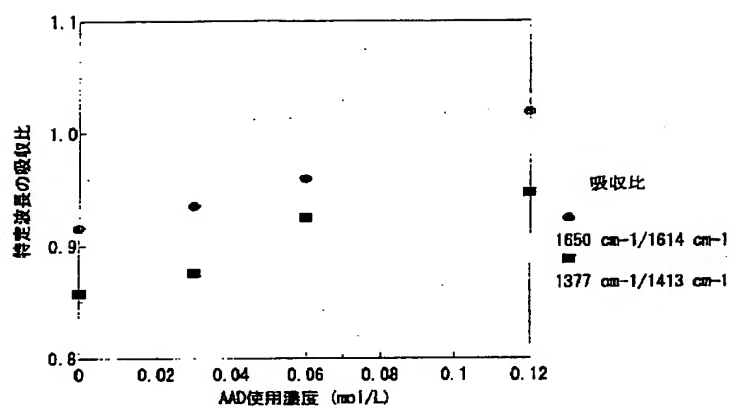
【図6】



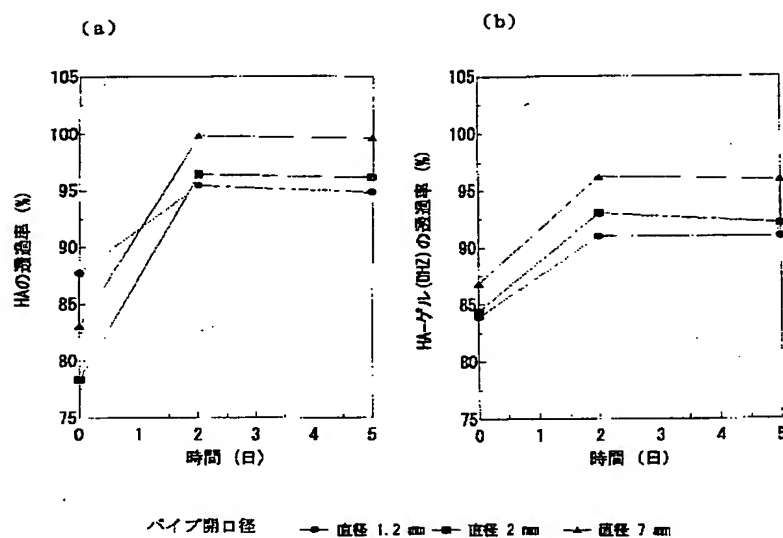
【図8】



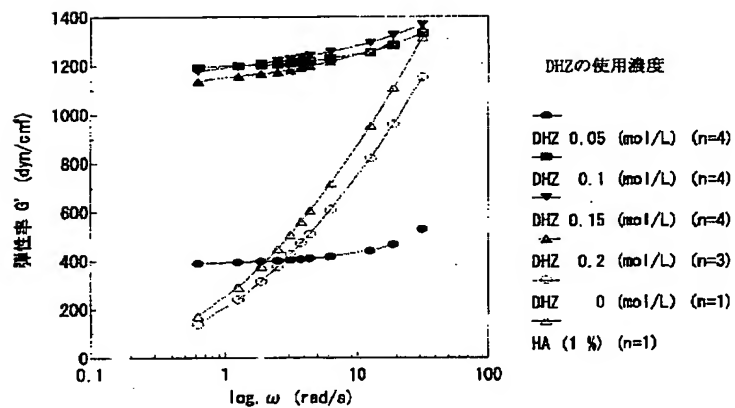
【図9】



【図10】



【図11】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**